

## **Oponentský posudek na doktorskou disertační práci MUDr. Aleše Krále**

### **Molecular basis of endothelial dysfunction: endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 genetic variations**

*Školící pracoviště:* Klinika dětského a dorostového lékařství 1.lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

*Školitel:* prof. MUDr. Pavel Martásek, Dr.Sc.

**Téma práce.** Doktorská disertační práce MUDr. Aleše Krále shrnuje výsledky studií zabývajících se možnými genetickými příčinami vzniku endoteliální dysfunkce a aterosklerózy. Studium se soustředí na dvě možné příčiny tohoto komplexního fenoménu a to na geneticky podmíněné poruchy funkce dvou důležitých enzymů, které jsou pro správnou funkci cévního endotelu nutné. Jedná se o endotelovou formu syntázy oxidu dusného (eNOS), která je jedním z hlavních mediátorů cévní homeostázy a o enzym hemovou oxygenázu-1 (HO-1), která zajišťuje obranu proti oxidativnímu stresu. Poruchy funkce obou enzymů jsou hledány na genetické úrovni, analýzou výskytu známých SNP mutací v kódujících i nekódujících oblastech genů a dinukleotidových repetitivních sekvencích v regulační části genu HO-1.

**Zpracování práce.** Po stránce obsahové i formální má předložená disertační práce MUDr. Aleše Krále vynikající úroveň. Práce je přehledná a dobře dokumentovaná. Celkový rozsah předkládané práce je 136 stran. Úvod do komplexní problematiky je napsán podrobně (zabírá na 30 stran textu), je ale přehledný a je doplněn dostatkem literárních odkazů. Cíle práce a testované hypotézy jsou shrnuty velmi koncizně a pro čtenáře velmi vhodně v samostatných oddílech. Popis metod, postupů, i souhrn výsledků se opírají o obě publikované autorovy práce i o práci zaslanou k posouzení do časopisu. Cenné je shrnutí výsledků a jejich diskuse a nastínění dalších perspektiv výzkumu. Literární odkazy jsou velmi podrobné, čítají odhadem na 300 položek. V neposlední řadě je třeba zdůraznit, že text je napsán velmi dobrou angličtinou.

**Cíle a výsledky práce.** Cíle disertační práce jsou shrnuty do tří bodů, všechny se týkají hledání důsledků genetických variací genů obou studovaných enzymů. První dva cíle se týkají sledování variací v kódující části genu eNOS: 1) změny v C-terminální části enzymu. Strukturální integrita C-terminální části enzymu eNOS je kritická pro jeho funkci. 2) sledování důsledků dříve známého SNP polymorfismu G894T, který vede k mutaci Q298D. Třetí cíl sleduje počet opakování dinukleotidu GT v promotorové části genu HO-1. Počet opakování ovlivňuje úroveň exprese genu a tím i jeho celkovou enzymatickou aktivitu a v důsledku i jeho schopnost protekce endotelia.

Genetické variace byly zkoumány na rozsáhlých souborech pacientů: 70 pacientů (cíle 2) a 3)), 81 pacientů (cíl 3)), a 150 pacientů (cíl 1)). Molekulárně genetické metody, postupy a materiály použité v práci jsou popsány dostatečně podrobně, zejména v autorových publikacích. Využívají se moderní, v současnosti dostupné metody a postupy. Hodnocení použitých invazivních chirurgických technik je mimo kompetenci oponenta.

Kladně lze hodnotit, že v řešené problematice, hlavně v obou publikacích i v submitovaném rukopise, jsou rutinně používány statistické techniky (i s některými drobnými výhradami k použité metodice).

Práce přispěla k málo řešené problematice korelací mezi polymorfismem obou studovaných enzymů, eNOS a HO-1, a podrobnou lékařskou charakteristikou konkrétních projevů aterosklerotického onemocnění, eventuálně odpovědím na jeho léčbu. Za nejvýznamnější výsledek práce lze považovat nově zjištěnou korelaci mezi polymorfismem GT repetice regulační části genu HO-1: alely s „dlouhými“ repeticemi GT mají nižší expresi enzymu, což vede ke zvětšení rizika závažných projevů aterosklerózy, k možnému vývoji plaků. Naopak zvýšení aktivity HO-1 vede k snížení zmíněných rizik. Na druhé straně se ukázalo, že (již známý) SNP polymorfismus Q298D v genu eNOS nemá prokazatelný negativní efekt při tvorbě aterosklerotických plaků. Byly ale nalezeny možné pozitivní zpětné vazby mezi zmíněnou mutací a léčbou statiny, kdy osoby s nemutovanou „protektivní variantou“ (nemutovaný G894 v DNA, neboli Q298 v proteinu v obou alelách) reagují na statinovou léčbu lépe.

Zásadní význam C-koncové části eNOS pro jeho enzymovou aktivitu byla nepřímou prokázána pozorovanou minimální variabilitou této části genu v nukleotidových sekvencích vyšetřovaných pacientů – výraznější variabilita patrně vede k netolerovatelnému snížení enzymové aktivity.

**Otázky.** Lékařsky anotované genetické studie zdravých i nemocných lidí osobně pokládám za jeden z nejzajímavějších současných směrů výzkumu, Kombinací praktické medicíny, obecných biologických a biochemických poznatků a bioinformatiky lze dojít k popisu vztahu fenotypu a genotypu. V této souvislosti mám velmi obecnou (a širokou) otázku, ke které mě částečně vede „negativní“ závěr o nepozorovaných SNP variacích v C-koncové oblasti genu eNOS. Existuje odhad přirozené hladiny genetické variability u lidské populace? Lze větší genetickou variabilitu očekávat v méně důležitých oblastech genomu?

Druhá, konkrétnější otázka se týká třetí autorovy práce k tématu, která shrnuje genetické variace C-terminální kódující části genu eNOS – do jakého časopisu byla zaslána?

**Závěr.** Disertační práce MUDr. Aleše Krále přináší originální poznatky s jednoznačnou molekulárně-diagnostickou i terapeutickou aplikací.

V předložené disertační práci prokázal MUDr. Aleš Král předpoklad k samostatné tvořivé vědecké práci. Doporučuji oborové radě doktorského studijního oboru „Biochemie a Patobiochemie“ práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.

V Praze 24. května 2015

Bohdan Schneider